

10/539183

Express Mail Label No. EV711807432US

JC20 Rec'd PCT/PTO 1 6 JUN 2005

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: OH-JIN PARK, ET AL.)
)
For: METHOD FOR PREPARING A (R)- OR (S)- FORM OF)
N-(2, 6-DIMETHYL PHENYL) ALANINE AND A COUNTER)
ENANTIOMERIC FOR OF N-(2, 6-DIMETHYL PHENYL) ALANINE)
ESTER THERETO USING ENZYME)

CLAIM FOR PRIORITY

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

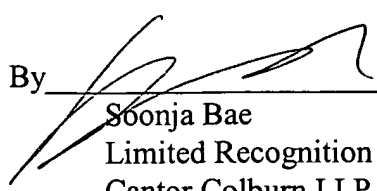
Applicants hereby claim the benefits of the filing date of December 18, 2002 to Korean Application No. 10-2002-0081152 under provisions of 35 U.S.C. 119 and the International Convention for the protection of Industrial Property.

If any fees are due with regard to this claim for priority, please charge them to Deposit Account No. 06-1130 maintained by Applicants' attorneys.

Respectfully submitted,

CANTOR COLBURN LLP

By


Soonja Bae

Limited Recognition No. L0017

Cantor Colburn LLP

55 Griffin Road South

Bloomfield, CT 06002

PTO Customer No. 23413

Telephone: (860) 286-2929

Fax: (860) 286-0115

Date: June 16, 2005

REC'D 23 DEC 2003

WIPO

401/ML 03/02673

RO/KR 05.12.2003

KR03/02673



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0081152
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 12월 18일
Date of Application DEC 18, 2002

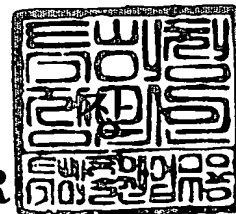
출원인 : 주식회사 엘지생명과학
Applicant(s) LG Life Sciences Ltd.



2003 년 12 월 05 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002. 12. 18
【발명의 명칭】	효소를 이용한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌과 그것의 대응 에스테르 화합물의 입체이성질체의 제조방법
【발명의 영문명칭】	Method for preparing an (R)- or (S)- form of N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine and a counter enantiomeric form of N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine ester thereto using enzyme
【출원인】	
【명칭】	주식회사 엘지생명과학
【출원인코드】	1-2002-030835-0
【대리인】	
【성명】	손창규
【대리인코드】	9-1998-000300-9
【포괄위임등록번호】	2002-087038-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박오진
【성명의 영문표기】	PARK, oh-j in
【주민등록번호】	680321-1639929
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛 APT 109-1206
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상후
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Who
【주민등록번호】	600322-1010916
【우편번호】	305-762
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포 APT 506-1704
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박태윤
【성명의 영문표기】	PARK, tae-yoon

【주민등록번호】	720226-1768311
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 388-11 럭키연립 6호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상현
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Hyung
【주민등록번호】	750305-1796711
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 LG화학 사원 APT 7-207
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정원교
【성명의 영문표기】	JOUNG, Won-Kyo
【주민등록번호】	650405-1405936
【우편번호】	305-330
【주소】	대전광역시 유성구 지족동 열매마을 APT 303-1004
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서병우
【성명의 영문표기】	SUH, Byoung-Woo
【주민등록번호】	570924-1122711
【우편번호】	305-721
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 럭키하나 APT 105-401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최증순
【성명의 영문표기】	CHOI, Jeung-soon
【주민등록번호】	720312-1476113
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 LG화학 사원 APT 3-213
【국적】	KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

조군호

【성명의 영문표기】

JOE, GOONHO

【주민등록번호】

570323-1405811

【우편번호】

305-721

【주소】

대전광역시 유성구 신성동 럭키하나 APT 106-603

【국적】

KR

【취지】특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인
손창규 (인)**【수수료】****【기본출원료】**

20 면 29,000 원

【가산출원료】

8 면 8,000 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

0 항 0 원

【합계】

37,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 효소를 이용하여 입체특이적으로 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌과 그것의 대응 에스테르 화합물을 제조하는 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는, 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 중 어느 한 종류((R)-광학이성질체 또는 (S)-광학이성질체)에 대해 입체특이적 가수분해성을 갖는 효소를 상기 라세미 혼합물과 반응시켜 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 광학분할하여 제조하거나, 또는 미반응물로부터 유기용매를 사용하여 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 화합물을 추출함으로써 이들을 광학분할하여 제조하는 방법을 제공한다.

【색인어】

metalaxyl, 효소, 광학순도, 광학분할, (R)-N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine ester

【명세서】

【발명의 명칭】

효소를 이용한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌과 그것의 대응 에스테르 화합물의 입체이성질체의 제조방법 {Method for preparing an (R)- or (S)- form of N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine and a counter enantiomeric form of N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine ester thereto using enzyme}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<1> 본 발명은 효소를 이용하여 입체특이적으로 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 ((R),(S)-N-(2,6-dimethyl phenyl) alanine)과 그것의 대응 에스테르 화합물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 라세미(racemic) (R),(S)- N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 중 어느 한 종류((R)-광학이성질체 또는 (S)-광학이성질체)에 대해 입체특이적 가수분해성을 갖는 효소를 상기 라세미 혼합물과 반응시켜 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 광학분할하여 제조하거나, 또는 미반응물로부터 유기용매를 사용하여 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 화합물을 추출함으로써 이들을 광학분할하여 제조한다. 또는, 효소에 의한 가수분해 반응으로부터 제조된 특정한 알라닌을 에스테르화 반응시켜 광학분할된 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 제조한다.

- <2> 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌과 이의 에스테르 화합물은 항균활성 (antifungal activity)을 가지는 Metalaxyl, Benalaxyl, Furalaxyl 등의 합성을 위한 중간체로 알려져 있다. 이들 화합물의 항균활성은 대체로 (R)-이성질체에 기인한다.
- <3> Metalaxyl의 (R)-광학이성질체인 Metalaxyl-M의 합성은 키랄(chiral) 금속 촉매의 존재 하에서 에나미드(enamide)의 수소첨가반응에 의하여 합성됨이 보고되어있다 (*Pesticide Science*, Vol. 54, 1998, pp 302-304). 이 반응은 고가의 금속촉매를 사용하며 고온과 고압의 반응조건하에서 광학순도(% enantiomeric excess, %ee) 95.6%ee로 Metalaxyl-M을 제조한다.
- <4> 광학활성물질 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 제조하는 방법 중의 하나로는, 라세미 혼합물에 광학활성 분할제(resolving agent)로서 광학적으로 순수한 아민(예를 들어, (R)- 또는 (S)-phenylethylamine)을 첨가하여 분리하는 광학분할기술(optical resolution)이 알려져 있다 (미국특허 제4,919,709호). 그러나, 상기 광학활성 분할제는 가격이 비싸고 공정이 복잡하다는 단점을 가지고 있다.
- <5> (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르를 합성하기 위한 하나의 방법으로서, 메틸 (S)-2-(히드록시)-프로파노에이트를 출발물질로 하여 이의 술포네이트 유도체를 제조하고, 염기 존재하에서 2,6-디메틸 아닐린과 반응시키는 방법이 보고되어있다 (W000/76960). 그러나, 이 반응을 통해서, 높은 광학순도의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르를 얻기 어려울 뿐만 아니라 (95%ee 이하), 고온과 유기용매를 사용한다는 문제점도 있다. 상기 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르는 chiral 형태의 benalaxyl, furalaxyl에도 적용가능한데, Metalaxyl-M의 경우 요구되는 광학순도는 95%ee 이상인 것이 바람직하다.
- <6> 한편, 특정 라세미 혼합물을 광학분할하기 위하여 에스테라아제(esterase), 리파아제(lipase), 프로테아제(protease) 등의 효소를 이용하여 선택적으로 거울상 이성질체를 가수분

해시키는 방법들이 알려져 왔다. 예를 들어, 라세미 메틸-2-클로로프로피오네이트 (Methyl-2-chloropropionate)를 *Candida rugosa* 유래의 리파아제를 이용하여 가수분해하는 방법이 보고되어있다 (Biotechnology & Bioengineering 30, 1987, pp 995-999). 또한, 정제된 *Candida rugosa* 유래의 리파아제를 이용하여 (R)-2-(4-히드록시페녹시) 프로피온산을 합성하는 것이 보고되었다 (WO90/15146).

<7> 라세미 혼합물의 분할에 효소를 이용하는 것은 매우 효과적일 수는 있지만, 어떠한 라세미체에 대해 효소 분할이 가능한지를 확인하는 것과, 특정 라세미체의 분할에 어떠한 효소가 특별히 효과적인지를 확인하는 것은 매우 어려운 일이다. 예를 들어, 미국특허 제5,928,933호는 라세미 4-옥소-1,2-피롤리딘디카르복실산 디알킬 에스테르의 광분할을 위하여 프로테아제, 리파아제 및 에스테라아제 중에서 선택된 44 가지 효소에 대해 반응 특이성을 실험하였고, 그 중 한 종류의 효소만이 95%의 광학순도를 나타냄을 보이고 있다. 이와 같이, 사용하는 효소의 종류 및 기질의 화학적 구조 등에 의해 이성질체의 선택성 및 광학순도(%ee)가 달라지므로 지속적인 연구를 통해 기질에 적합한 조합을 찾아내는 것이 무엇보다도 중요하다,

<8> 한편, 본 발명에서 광학분할의 대상으로 삼고있는 라세미체인 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르에 대하여, 그것의 광학분할에 효소를 이용한 예는 아직까지 보고되어있지 않다. 기존의 효소를 이용한 광학분할은 주로 prop류의 제초제의 중간물질인 aryloxypropionic acid의 합성, -profen류의 항염증제의 중간물질인 arylpropionic acid의 합성에만 국한되었고, 본 발명에서 다루고자 하는 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르의 광학분할에 효소를 사용한 예가 없다.

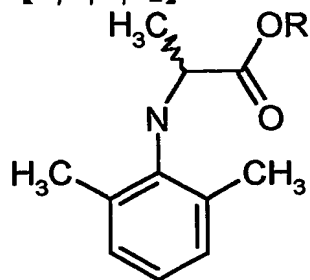
【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <9> 이에 본 발명자들은, 광범위한 연구를 수행한 결과, 라세미 (R), (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 그것의 특정 광학이성질체(R형 또는 S형 광학이성질체)에 대해 가수분해 특이성을 갖는 효소와 상온, 상압에서 반응시킬 때, 광학 순도가 매우 우수한(> 96-99%ee) (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌과, 그것의 대응 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 제조할 수 있음을 발견하고, 본 발명에 이르게 되었다.
- <10> 따라서, 본 발명의 목적은 효소에 의한 광학분할에 의해 높은 광학순도를 갖는 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌과, 그것의 대응 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 경제적으로 제조할 수 있는 방법을 제공하는데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <11> 우선, 본 발명의 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 제조방법은,
- <12> (A) 하기 화학식 1의 라세미 (R), (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 그것의 특정 광학이성질체(R형 또는 S형 광학이성질체)에 대해 가수분해 특이성을 가지는 반응 유효량의 효소와 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 생성하는 단계; 및
- <13> (B) 상기 반응물 중의 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을, 미반응 대응 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르로부터 분리하는 단계를 포함하는 것으로 구성되어 있다.

<14> 【화학식 1】



<15> 상기 식에서, R 은 치환되거나 또는 치환되지않은 탄소수 1-18의 선형 내지 가지형 알킬 또는 알케닐, 치환되거나 또는 치환되지않은 탄소 3-6의 시클로알킬, 치환되거나 또는 치환되지않은 아릴 알킬, 및 치환되거나 또는 치환되지않은 헤테로아릴 알킬로 이루어진 군에서 선택된다.

<16> 상기 R 의 구체적인 예로는, 메틸, 에틸, n-프로필, 이소프로필, n-부틸, 2-부틸, 2-펜틸, 3-메틸-1-부틸, 2-에틸-1-헥실, 2-클로로에틸, 2-브로모에틸, 3-클로로프로필, 3-브로모프로필, 2,2-디클로로에틸, 1-클로로-2-프로필, 올레일, 시클로헥실, 1-시클로프로필메틸, 알릴, 페닐, 벤질, 프로파아르길, 2-페녹시-1-에틸, 2,4-디클로로벤질, 메톡시에틸, 에톡시에틸, 1-티오에톡시에틸 등을 들 수 있다.

<17> 다음으로, 본 발명의 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르의 제조방법은,

<18> (A') 상기 화학식 1의 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 그것의 특정 광학이성질체(R형 또는 S형 광학이성질체)에 대해 가수분해 특이성을 가지는 반응 유효량의 효소와 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 생성하는 단계; 및,

- <19> (B') 상기 반응물 중의 미반응 대응 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 생성된 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌으로부터 분리하는 단계를 포함하는 것으로 구성되어있다.
- <20> 상기 단계(A') 및 (B')는 앞서 설명한 단계(A) 및 (B)와 사실상 동일하다. 경우에 따라서는, 상기 단계(B') 대신에 하기 단계(C')를 포함하거나 또는 단계(B') 이후에 하기 단계(C')를 더 포함할 수 있다.
- <21> (C') 상기 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 알코올(R-OH; 여기서의 R 은 화학식 1에서와 동일함)과 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 합성하는 단계.
- <22> 이하에서는, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.
- <23> 광학분할을 행하는 대상인 상기 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르의 제조방법은 당업계에 공지되어 있는바, 그러한 하나의 예로는, 2-브롬 프로피온산 (2-bromopropionic acid)과 2,6-디메틸아닐린(dimethylaniline)의 반응을 들 수 있다. 그러나, N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르의 라세미 혼합물(이하, 라세미 에스테르 혼합물로 약칭하기도 함)은, R형 광학이성질체와 S형 광학이성질체 그자체의 물리화학적 특성 차이가 적으므로, 일반적인 분리 방법들로는 분리하기 매우 어렵다.
- <24> 따라서, 상기 라세미 에스테르 혼합물 중에서, R형 광학이성질체[(R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르] 및 S형 광학이성질체[(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르] 중의 어느 하나에 대해 가수분해 특이성을 가진 효소(이하, 특이적 가수분해 효소로 약칭하기도 함)를 사용하는 본 발명은, 상기 라세미 에스테르 혼합물의 광학

분할을 위한 종래의 합성 또는 분리방법들과 비교하여, 간단하고 저렴한 방법에 의해 특정한 광학이성질체를 제조한다는 점에서, 당해 분야에서 혁신적인 장점을 가진다.

- <25> (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 제조방법에 관한 상기 단계(A)는, 상기 라세미 에스테르 혼합물을 수용액, 또는 소량의 유기용매를 포함하는 유기용매-수용액 혼합액에 녹인 뒤, 온도와 pH를 일정하게 유지한 상태에서 특이적 가수분해 효소와 반응시킨다.
- <26> 따라서, 상기 특이적 가수분해 효소가 R형 광학이성질체에 대해서만 특이적으로 가수분해 능력을 가진 경우에는, 단계(A)의 반응에 의해 R형 광학이성질체만이 가수분해되어 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌이 생성되고, S형 광학이성질체, 즉, (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르는 미반응상태로 남게 된다. 반대로, 상기 특이적 가수분해 효소가 S형 이성질체에 대해서만 가수분해 능력을 가진 경우에는, 단계(A)의 반응에 의해 S형 광학이성질체만이 가수분해되어 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌이 생성되고, R형 광학이성질체, 즉, (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르는 미반응 상태로 남게 된다.
- <27> 반응계가 수용액만으로 이루어진 경우에는, 상기 단계(B)에서 유기용매를 사용하여 미반응 에스테르 화합물(R형 또는 S형 광학이성질체)을 추출할 수 있다. 반면에, 반응계가 유기용매-수용액 혼합액으로 이루어진 경우에는, 미반응 에스테르 화합물이 물에는 용해되지않지만 유기용매에 용해되므로, 유기용매층을 분리함으로써 이를 손쉽게 분리할 수 있다.
- <28> 한편, 수용액에 포함되어있는 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌은 수용액을 산성화한(acidify) 뒤 유기용매를 이용하여 추출하고, 그로부터 다시 유기용매를 제거함으로써, 광학적으로 순수한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 얻을 수 있게 된다. 실험결과

, 이들의 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 광학 순도는 매우 높은 것으로 확인되었다 (> 96-99%ee).

<29> 또한, 미반응 대응 화합물로서 분리되는 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르나, 또는 그것의 제조방법과 관련하여 상기 단계(C')에서 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 에스테르화 반응에서 제조된 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 역시 높은 광학 순도를 가지는 것으로 확인되었다 (> 96-99%ee).

<30> 상기 화학식 1에서의 R 이, 알릴(allyl), 2-클로로에틸(2-chloroethyl), 메톡시에틸(methoxyethyl), 또는 에톡시에틸(ethoxyethyl)인 경우에는, 반응시간이 짧고, 더욱 높은 광학 순도가 얻어질 수 있으므로, 더욱 바람직하다.

<31> 상기 특이적 가수분해 효소는, R형 광학이성질체나 S형 광학이성질체의 어느 하나를 특이적으로 가수분해하는 능력을 가지고 있다면 특별히 제한되는 것은 아니지만, 미생물, 동물 또는 식물 유래의 리파아제(lipase), 프로테아제(protease) 또는 에스테라아제(esterase) 중에 선택된 것이 바람직하다.

<32> 상기 효소 중에서 반응의 전환율과 광학순도가 높은 리파아제가 더욱 바람직하다. 그 중에서도 Pseudomonas 유래 리파아제 AK, Toyobo Immobilized lipase, Lioprotein lipase, Burkholderia 유래의 리파아제 PS, AH, Alcaligenes 유래의 리파아제 QLM, Candida 유래 리파아제 OF 등에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 것이 enantioselectivity와 속도면에서 특히 바람직하다.

<33> 사용되는 효소의 종류에 따라 R형과 S형 광학이성질체에 대한 선택성이 결정되며, 사용 형태는 분말 또는 수용액일 수 있다. 경우에 따라서는, 재사용을 위해 담체에 고정화한 것일

수도 있다. 효소의 고정화 방법은 고분자 담체나 세라이트(celite)와 같은 무기담체에 효소를 부착하는 등 다양한 예가 당업계에서 공지되어있으므로, 이에 대한 자세한 설명은 본 명세서에서 생략한다.

<34> 효소의 사용량은, 반응온도, pH, 수용액의 량, 반응시간 등 여러 반응요소들에 의해 결정되므로 유효 사용량은 가변적이지만, 기질(라세미 에스테르 혼합물)의 중량을 기준으로 대략적으로 0.1-100 중량%인 것이 바람직하며, 너무 적은 경우에는 반응시간이 길어지는 문제점이 있고, 너무 많은 경우에는 효소의 과량 사용이라는 경제적 측면과 분리 등의 반응공정적 측면에서 바람직하지 않다.

<35> 반응조건은 특별히 제한되는 것은 아니지만, 효소반응의 최적화를 위하여 0-60℃, pH 3-12가 바람직하다. 더욱 바람직한 반응온도는 30-50℃이다. 앞서의 설명과 같이, 단계(A)의 반응은 수용액내에서 진행될 수 있으며, 기질의 용해도를 증가시키고 생성물의 효소활성 저해를 줄이기 위하여 소량의 유기용매를 포함하는 유기용매-수용액 혼합액의 사용도 가능하다.

<36> 효소반응을 위한 기질의 농도 역시 여러 반응요소들에 의해 변화될 수 있으며, 효소반응의 최적화를 위해서는 500 mM - 1 M이 바람직하지만, 더 높은 농도로 사용될 수도 있다. 단계(A) 및 (A')의 가수분해반응에 있어서, 반응초기에는 에스테르 화합물이 물에 잘 녹지 않지만 물에 용해된 에스테르 화합물과 효소의 접촉에 의해 반응이 진행된다. 효소반응의 속도를 증가시키고 효소의 활성을 유지하기 위하여, 최소량의 물과 주로 유기용매로 이루어진 반응액에서도 가능하다.

<37> 효소반응의 상기 용매로서, 아세톤, 아세토나이트릴, 알코올 등과 같은 친수성 용매와, 이소프로필에테르, tert-부틸 메틸 에테르(tert-butyl methyl ether: TBME), 클로로포름, 디클

로로메탄, 사염화탄소, 헥산, 톨루엔 등과 같은 소수성 용매가 사용될 수 있고, 경우에 따라서는 이들의 이상(two-phase) 반응용매도 사용될 수 있다.

- <38> 효소반응의 최적 조건은 앞서 설명한 내용뿐만 아니라 기타 다양한 반응요소들도 함께 고려하여 적절히 설정될 수 있다.
- <39> 상기 단계(B) 또는 (B')에서의 추출에 사용되는 유기용매로는 에틸아세테이트, 이소프로필에테르, tert-butyl methyl ether(TBME), 클로로포름, 디클로로메탄, 사염화탄소, 헥산, 톨루엔 등으로부터 선택된 하나 또는 이들의 혼합물이 바람직하다.
- <40> 상기 단계(C')에서의 에스테르 반응은 카르복실기를 가진 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌과 알코올의 반응으로서, 최종적으로 소망하는 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌 에스테르를 제조할 수 있는 반응조건이라면 특별히 제한되지 않으며, 이러한 에스테르 반응은 당업계에 공지되어있으므로, 이에 대한 설명은 본 명세서에서 생략한다.
- <41> 이하, 다수의 실시예들을 참조하여 본 발명의 구체적인 내용을 예시하지만, 본 발명의 범주가 그것에 의해 한정되는 것은 아니다.
- <42> [실시예 1] 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌 메틸 에스테르를 가수분해하는 효소의 선별 (스크리닝)
- <43> 450 microL (0.1 M, pH 7)의 인산 칼륨(potassium phosphate) 완충용액에, 기질용액 50 microL(라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌 메틸 에스테르 50 microL를 500 uL의 아세토니트릴에 녹인 용액)을 혼합하고, 25 mg의 효소분말(액체인 경우 20 microL)을 추가한 후, 30C에서 각각 1 일 및 2 일간 반응시켰다. 반응의 전환율 분석은 HPLC를 이용하여 C18 역상 컬럼(reverse phase column)에서 아세토니트릴:물(70:30, 0.1% trifluoroacetic acid)을 이동

상으로 하여, UV파장 254 nm에서 분석하였다. 실험에 사용된 효소의 종류와 전환율의 결과를 하기 표 1에 나타낸다.

<44> 【표 1】

Enzyme	source	conv. (%)	
		1day	2day
Optimase	<i>Bacillus licheniformis</i>	61	83
Alcalase	<i>Bacillus licheniformis</i>	60	83
Lipase PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	50	56
Novozym 435	<i>Candida antarctica</i>	100	-
Lipase OF	<i>Candida rugosa</i>	47	57
Lipase PL	<i>Alcaligenes</i> sp.	32	49
Lipase PS-D	<i>Burkholderia cepacia</i>	53	61
Lipase PS-C	<i>Burkholderia cepacia</i>	56	60
Lipase AL	<i>Achromobacter</i> sp.	19	23
Lipase QLM	<i>Alcaligenes</i> sp.	60	76
Proleather FG-F	<i>Bacillus subtilis</i>	56	79
Acylase Amano	<i>Aspergillus melleus</i>	51	65
Protease PS	<i>Bacillus</i> sp.	100	-
Immobilized lipase (Toyobo)	<i>Pseudomonas</i> sp.	45	50
Lipoprotein lipase (Toyobo)	<i>Pseudomonas</i> sp.	61	69
Lipase AH	<i>Burkholderia cepacia</i>	56	62
PLE-AL amano	<i>Porcine liver</i>	100	-
Alcalase 0.6L	<i>Bacillus licheniformis</i>	35	48
Alcalase 2.5L	<i>Bacillus licheniformis</i>	65	84
Novozym 525L	<i>Candida antarctica</i>	100	-
ChiroCLEC-CAB	<i>Candida antarctica</i>	100	-

<45> 상기 표 1에서, 일정한 시간 경과 후의 반응 전환율이 50% 전후인 효소는 R형 광학이성질체나 S형 광학이성질체에 대해 반응의 광학이성적 선택성이 높을 가능성이 있는 효소를 의미한다고 할 수 있다. 그러한 점에서, 각종 리파아제는 상기 라세미체에 대한 광학이성적 선택성이 높은 후보군임을 예측할 수 있다.

<46> [실시예 2]

<47> (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르가 풍부한 경우(R:S = 90:10)와 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르가 풍부한 경우(R:S = 4:96)를 제조하여 실시예 1과 같은 방법으로 반응시켜 전환율을 측정하였다. 사용된 효소의 종류와 전환율의 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

<48> 【표 2】

Enzyme	source	conv. (%)	
		(R)-ester	(S)-ester
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	79	17
Lipase AH	<i>Burkholderia cepacia</i>	47	12
Lipase PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	86	17
Lipase QLM	<i>Alcaligenes sp.</i>	96	19

<49> 상기 표 2의 결과에서, 특히 리파아제 AK, PS, QLM 등이 상기 라세미체의 R형 광학이성질체에 대해 높은 광학이성적 선택성을 가지고 있음을 알 수 있다.

<50> [실시예 3] 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 알릴 에스테르는 바, 와 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르 광학분할을 위한 효소선별

<51> 효소분말 2 mg을 0.1 M 인산 칼슘 버퍼(pH 7.0) 1 mL에 현탁시킨 후, 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 알릴 에스테르 20 mg을 투입한 뒤, 혼합물을 35℃에서 200 rpm으로 셰이킹(shaking)하였다. 각각 3시간 및 24시간 후에 20 l를 견본추출(sampling)하여 헥산:이소프로필 알코올의 혼합액(hexane:isopropyl alcohol =95:5)에 녹인 후, 5% Na₂CO₃를 사용하여 pH 10으로 조절하였다. 유기용매층에는 에스테르 화합물이 존재하였으며, 물층은 1N HCl을 사용하여 pH 3-4로 조절한 후, 에틸 아세테이트로 추출하였다. 층분리 후 유기용매를

감압증류에 의해 제거하고 헥산:이소프로필 알코올의 혼합액(95:5)에 녹인후, 선택도를 분석하였다.

<52> 상기 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 알릴 에스테르 대신에 라세미

(R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르를 사용하였다는 점을 제외하고, 상기 동일한 방법으로 실험을 반복하였다.

<53> 분석조건은 다음과 같다.

<54> * HPLC 분석조건

<55> chiracel OD column, 30℃, 0.8mL, 254nm

<56> acid 분석 - Hexane:Isopropyl alcohol:Trifluoroacetic acid = 95: 5:0.1

<57> ester 분석 - Hexane:Isopropyl alcohol = 100:1

<58> 실험 결과를 하기 표 3에 나타낸다.

<59> 【표 3】

Enzyme	allyl ester				2-chloroethyl ester			
	conv.(%)		%ee _p (R)		conv.(%)		%ee _p (R)	
	3hr	24hr	3hr	24hr	3hr	24hr	3hr	24hr
Lipase AK	33.5	50.3	99.4	98.8	49.2	—	97.8	—
Lipase GF	—	23.1	—	100	—	14.0	—	98.2
Lipase AG	—	16.7	—	50	—	—	not selective	
Lipase AH	20.6	50.2	100	99.2	49.8	—	98.6	—
Novozym 435	not selective						not selective	
Esterase CCE	—	66.7	—	4			not selective	
Esterase PPE	—	2.3	—	85.4	—	4.1	—	91.8
Lipase TL	14.4	53.2	94.8	80.8	53.5	—	86.3	—
Lipase UL	—	2.0	—	100	4.1	6.2	93	22
Lipase AL	—	3.8	—	100	6.2	25.1	91.4	95.6
Lipase QLM	41.4	49.7	99.0	97.0	—	60.8	—	62
Immobilized lipase (Toyobo)	7.7	47.7	95.8	96.6	22.3	52.7	90.4	70
Lipase BG*	—	—	—	—	—	46.1 (17hr)	—	91.5 (17hr)

<60> $\text{Conv.} = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<61> Conv.는 전환율을 의미하며 ee_p 와 ee_s 는 생성물과 반응물의 광학순도를 나타내주는 인자이다.
다음과 같은 식으로 나타낼 수 있다.

<62> $ee_p = [(\text{R})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌} - (\text{S})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌}] / [(\text{R})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌} + (\text{S})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌}]$

<63> $ee_s = [(\text{R})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스터} - (\text{S})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스터}] / [(\text{R})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스터} + (\text{S})\text{-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스터}]$

<64> 상기 표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 특정 리파아제는 상기 라세미체의 알릴 에스테르와 2-클로로에틸 에스테르 모두에 있어서 50% 전후의 높은 전환율과 광학이성적 반응 선택성을 가지며, 에스테르의 종류에 따라 최적 반응시간은 다를 수 있다.

<65> [실시예 4] Lipase OF에 의한 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르의 광학분할

<66> 20 mg의 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르를 0.1 M 인산 칼륨 버퍼(pH 7.0) 1 mL에 넣고, Lipase OF를 2 mg 첨가한 뒤, 35℃에서 200 rpm으로 셰이킹하면서 반응을 수행하였다. 반응의 분석은 실시예 3과 같이 수행하였다. 17 시간 반응 후 41.4% 전환율에서 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 70.8 %ee로 얻어졌다. *Candida rugosa* 유래의 Lipase OF는 여러가지의 isozyme이 혼합된 형태로서 그 중의 특정한 isozyme의 경우 광학순도를 더 높일 수 있을 것이다.

<67> [실시예 5] 에스테르의 종류에 따른 효소 반응성

<68> 다양한 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르 20 mg을 0.1 M 인산 칼륨 버퍼(pH 7.0) 1 mL에 녹인 뒤, Lipase PS를 2 mg 첨가하여, 실시예 3과 같은 방법으로 실험을 행하고 분석을 실시하였다. 그 결과를 하기 표 4에 나타낸다.

<69> 【표 4】

Ester	conv.(%)		%ee _p (R)	
	3hr	24hr	3hr	24hr
2-chloroethyl	48.3	52.6	97.0	90.2
2-bromoethyl	36.5	62.1	84.4	21.6
3-chloropropyl	12.2	48.0	99.2	99.4
3-bromopropyl	6.2	38.8	100	100
2,2-dichloroethyl	35.5	51.8	98.6	93.2
1-chloro-2-propyl	-	10.7	-	100
methoxyethyl	39.6	52.1	99.0	92.0
ethoxyethyl	48.1	51.2	98.8	95.4
1-thioethoxyethyl	10.0	34.4	88.0	96.8
isopropyl	-	11.2	-	86.8
2-butyl	-	12.7	-	100
2-pentyl	-	9.2	-	61.4
3-methyl-1-butyl	-	25.3	-	100
2-ethyl-1-hexyl	-	28.4	-	96.8
benzyl	-	< 10	-	96.6
2-phenoxy-1-ethyl	14.7	37.9	97.6	95.8
2,4-dichlorobenzyl	-	4.1	-	65
oleyl	-	12.0	-	98.4
allyl	32.5	50.5	99.6	98.0
propargyl	42.8	53.5	96.6	87.0
methyl	17.1	41.5	96.6	97.2
ethyl	37	-	98.6	-
n-propyl	37	-	97.6	-
n-butyl	33.9	-	98.4	-
cyclohexyl	0.26	-	23.2	-
1-cyclopropylmethyl	-	8.8	-	99.0
phenyl	-	-	23.2	-
trifluoroethyl	-	-	-	not selective
n-butanethioester	-	-	45.0	-

<70> $\text{Conv.} = ee_s / (ee_s + ee_p)$

<71> 상기 표 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 2-chloroethyl, 2-bromoethyl, allyl, methoxyethyl, ethoxyethyl ester 등이 특히 바람직하다.

<72> [실시예 6] 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르의 광학분할

<73> 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르 500 mg을 2.5 mL 인산 칼륨 버퍼(pH 7.0)에 넣고(200 g/L scale), 효소 10 mg(ester : enzyme = 50:1)을 첨가한 뒤, 35℃에서 200 rpm으로 세이킹하여 반응을 행하였다. 반응의 분석은 실시예 3과 같은 방법으로 수행하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타낸다.

<74> 【표 5】

Enzyme	Source	conv.(%)			%ee _p (R)		
		6hr	24hr	36hr	6hr	24hr	36hr
Lipases AH	<i>Burkholderia cepacia</i>	6.2	21.1	31.5	96.0	98.8	98.2
Lipase AK	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	16.8	36.8	45.4	96.8	98.8	97.2
Lipase PS	<i>Burkholderia cepacia</i>	21.2	40.7	45.3	98.6	98.6	95.2
Lipase QLM	<i>Alcaligenes sp.</i>	25.0	44.0	47.1	98.4	97.0	94.8
Lipase TL	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	25.9	41.6	44.8	94.4	90.4	88.4

<75> $\text{Conv.} = \text{ee}_s / (\text{ee}_s + \text{ee}_p)$

<76> 반응시간에 따라 약간의 차이는 있지만, 상기 라세미체는 표 5의 리파아제들에서 우수한 전환율과 광학순도를 나타내며, 특히, Lipase AK, PS, QLM 등은 50%에 가까운 전환율과 높은 광학순도를 보여준다.

<77> [실시예 7] 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르의 기질-효소 비율에 따른 광학분할

<78> 1 g의 각종 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 2.5 mL(400 g/L) 0.5 M 인산 칼륨 버퍼(pH 7)에 첨가한 뒤, Lipase PS 양을 달리하면서 기질과 효소의 비율을 변화시켜, 35℃에서 200 rpm으로 세이킹하며 반응을 행하였다. 분석은 실시예 3과 동일하게 수행하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타낸다.

<79> 【표 6】

Lipase PS amount	2-chloroethyl ester				methoxyethyl ester				ethoxyethyl ester			
	conv.(%)		%ee _p (R)		conv.(%)		%ee _p (R)		conv.(%)		%ee _p (R)	
(ester:enzyme)	1d.	2d.	1d.	2d.	1d.	2d.	1d.	2d.	1d.	2d.	1d.	2d.
10 mg (100:1)	18.2	31.2	98.6	98.0	15.7	30.3	98.4	96.8	15.5	26.2	99.2	99.0
20 mg (50:1)	29.4	39.3	98.4	97.6	28.7	38.1	98.2	97.6	22.5	31.1	99.0	98.4
50 mg (25:1)	35.5	41.9	98.2	96.6	40.6	45.0	97.4	98.2	28.0	39.4	98.6	97.8

<80> $\text{Conv.} = \text{ee}_s / (\text{ee}_s + \text{ee}_p)$

<81> 상기 표 6에서 보는 바와 같이, 효소의 사용량이 많을수록 전환율은 높아짐을 알 수 있고, 효소의 최적 사용량은 효소의 종류, 에스테르의 종류, 전환율 및 광학순도 등 다양한 요소들을 모두 고려하여 선택하는 것이 바람직함을 알 수 있다.

<82> [실시예 8] 고정화 Lipase PS에 의한 라세미체 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르의 광학분할

<83> 0.1 g Lipase PS를 0.1 M 인산 칼슘 버퍼(pH 7.0) 10 mL에 녹인 뒤, 교반하면서 상온에서 방치한 후 필터링하여 불용성 물질을 제거하였다. 용액 4.5 mL을 1 M 인산 칼슘 버퍼(pH 7.0)에 혼합한 후, Sepabeads FP-EP16 (Resindion) 30 mg과 혼합하고 상온에서 24 시간동안 교반하였다. 그런 다음, 고정화 효소액을 필터링하였다. 이렇게 비드(beads)에 고정된 효소를 0.1 M 트리스 버퍼(Tris buffer :pH 7) 1 mL에 넣고, (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸

에스테르 10 mg을 첨가한 후, 35℃에서 200 rpm으로 세이킹하면서 17 시간동안 반응시켰다.

분석은 실시예 3과 같은 방법으로 수행하였다.

<84> Eupergit C^(R) (Rohm)에 대해서도 상기 동일한 방법으로 실험을 반복하였다.

<85> Sepabeads FP-EP16의 경우 25% 전환율에서 98.5 %ee의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을, Eupergit^(R) C의 경우 46% 전환율에서 98.4 %ee의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 얻었다.

<86> [실시예 9] 고정화 Lipase PS에 의한 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르의 광학분할

<87> 0.1 g Lipase PS를 0.1 M 인산 나트륨 버퍼(pH 6.0) 5.0 mL에 녹인 뒤 교반하면서, 폴리아크릴레이트 수지인 XAD^(R)-7HP(Rohm & Haas)의 양을 100 mg(resin:enzyme = 1:1), 250 mg, 500 mg, 1.0 g으로 각각 달리하여 첨가하였다. 그런 다음, 30℃에서 24 시간동안 교반한 후 필터링하여, 수지와 불용성 물질을 0.1 M 인산 나트륨 버퍼(pH 6.0)에 넣고 글루타르알데히드 (glutaraldehyde)를 5 μ L첨가한 후, 상온에서 3 시간동안 교반하였다. 얻어진 고정화 효소 (Lipase PS 10 mg에 해당)를 0.5 M 인산 칼륨 버퍼(pH 8) 1 mL에 넣고, (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 2-클로로에틸 에스테르 100 mg을 첨가한 후, 35C에서 200 rpm으로 세이킹하면서 16 시간동안 반응시켰다. 분석은 실시예 3과 같은 방법으로 수행하였다. 그 결과를 하기 표 7에 나타낸다.

<88>

【표 7】

Lipase PS	XAD-7HP amount	conv.(%)	%ee _p (R)
100 mg	100 mg	16	87.0
100 mg	250 mg	23	93.0
100 mg	500 mg	40	95.6
100 mg	1000 mg	49	96.3

<89> $\text{Conv.} = \text{ee}_s / (\text{ee}_s + \text{ee}_p)$

<90> [실시예 10] 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르의 양산 광학분할

<91> 30 mL 증류수에 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르 20 mL(400 g/L 농도)를 첨가하고, 500 mg의 Lipase PS를 첨가한 후, 40℃에서 스티링(30%, Mettler DL70 titrator)하면서 반응을 수행하였다. 반응액의 pH를 일정하게 유지하기 위하여 1N NaOH를 자동적으로 첨가하였다(Mettler DL70 titrator). 24 시간 후에 250 mg의 Lipase PS를 추가로 첨가하였다. 분석은 실시예 3과 같은 방법으로 수행하였다. 40.2%의 전환율(6day)에서 96.9 %ee의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 얻었다.

<92> [실시예 11] 효소에 의한 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메틸 에스테르 광학분할과 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 분리

<93> 실시예 9의 반응액을 여과하여 불용성 물질을 제거한 뒤, 여과액(filtrate)를 2.72 g의 Accurel MP1000(메탄올과 증류수로 세척한 후 사용)가 충전되어있는 유리 컬럼(glass column)에 통과시켰다. 여과액에 에틸 아세테이트를 넣고 pH 9로 조절한 후, 에틸 아세테이트층을 키랄(chiral) HPLC로 분석하여, (S)-ester:(R)-ester = 95.6:1.1(area %ratio), ester:acid =

96.7:0.87(area %ratio)를 얻었다. 또한, 수용액층을 산성화(acidify)하여 에틸 아세테이트로 추출하고 용매를 증발시킨 후, 키랄 HPLC로 분석하여, (R)-acid 97.2 %ee , ester:acid = 0.42:99.58(area % ratio)로 광학적으로 순수한 흰색의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 정량적으로 얻었다.

<94> [실시예 12] 효소에 의한 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메톡시에틸 에스테르의 광학분할과 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 분리

<95> 24 g의 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 메톡시에틸 에스테르를 0.5 M 인산 칼륨 버퍼(pH 7.0) 50 mL에 첨가하고 Lipase PS 1.0 g를 첨가한 뒤, 35℃에서 200 rpm으로 셰이킹하면서 반응을 수행하였다. 그런 다음, 40% 전환율에서 반응을 중지한 후, 에틸 아세테이트를 첨가하고 수용액층의 pH를 10으로 조절한 뒤, 에틸 아세테이트층을 분리하고 물을 첨가하였다. 수용액층의 pH를 3-4로 조절하고, 에틸 아세테이트층을 MgSO₄로 건조한 후 필터링하고, 에틸 아세테이트를 증발시켜, (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌(키랄 HPLC분석, %96 ee) 5.3g 얻었다(57.4% isolated yield).

<96> [실시예 13] (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 에스테르화 반응

<97> 5.03 g의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌(96 ee%)를 15 g의 메틸 알코올에 녹인 후, 0℃에서 티오닐 클로라이드(thionyl chloride) 3.25 g (1.05 equivalent)을 적가하였다. 2 시간 동안 환류(reflux)시킨 후 GC분석한 결과, 2.5%의 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌가 존재함을 확인하였다. 용매를 증발시킨 후, 톨루엔 30 mL을 첨가하고 50 mL Na₂CO₃로 5 번 세척한 뒤,

틀루엔층을 분리하고 MgSO_4 로 건조하여 용매를 제거하였다. 얻어진 (R)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌 메틸 에스테르(4.2g, 78% isolated yield)를 키랄 HPLC로 분석한 결과, 97.3 %ee의 광학순도를 나타내었다(chemical purity 97.2% ester determined by GC analysis).

<98> 본 발명이 속하는 분야에서 통상의 지식을 가지라면, 상기 내용을 바탕으로 본 발명의 범주내에서 다양한 응용 및 변형을 행하는 것이 가능할 것이다.

【발명의 효과】

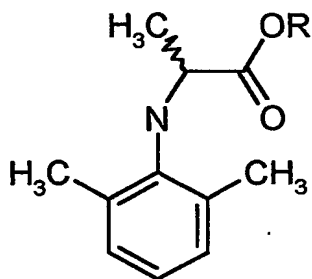
<99> 본 발명에 따르면, 광학이성질체들(R형 및 S형)의 물리화학적 특성의 차이가 적어서 종래의 방법으로는 광학분할이 어려운, 라세미 (R),(S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌 에스테르를 간단하고 저렴한 방법으로 광학분할하여, 항균활성을 가지는 Metalaxyl, Benalaxyl, Furalaxyl 등의 합성을 위한 중간체인 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌과, 그것의 에스테르 화합물을 높은 광학순도와 수율로서 용이하게 제조할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(A) 하기 화학식 1의 라세미 (R), (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 그것의 특정 광학이성질체(R형 또는 S형 광학이성질체)에 대해 가수분해 특이성을 가지는 반응 유효량의 효소와 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 생성하는 단계; 및

(B) 상기 반응물 중의 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을, 미반응 대응 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르로부터 분리하는 단계를 포함하는 것으로 구성되어있는, 광학적으로 순수한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌의 제조방법.



(1)

상기 식에서, R 은 치환되거나 또는 치환되지않은 탄소수 1-18의 선형 내지 가지형 알킬 또는 알케닐, 치환되거나 또는 치환되지않은 탄소 3-6의 시클로알킬, 치환되거나 또는 치환되지않은 아릴 알킬, 및 치환되거나 또는 치환되지않은 헤테로아릴 알킬로 이루어진 군에서 선택된다.

【청구항 2】

(A') 상기 화학식 1의 라세미 (R), (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 그것의 특정 광학이성질체(R형 또는 S형 광학이성질체)에 대해 가수분해 특이성을 가지는 반응 유효량의 효소와 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 생성하는 단계; 및,

(B') 상기 반응물 중의 미반응 대응 (S)- 또는 (R)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를, 생성된 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌으로부터 분리하는 단계를 포함하는 것으로 구성되어있는, 광학적으로 순수한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르의 제조방법.

【청구항 3】

제 2 항에 있어서, 상기 단계(B') 대신에 하기 단계(C')를 포함하거나 또는 단계(B') 이후에 하기 단계(C')를 더 포함하는 제조방법.

(C') 상기 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌을 알코올(R-OH; 여기서의 R 은 화학식 1에서와 동일함)과 반응시켜, (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐) 알라닌 에스테르를 합성하는 단계.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, R 이 알릴, 2-클로로에틸, 2-브로모에틸 메톡시에틸, 또는 에톡시에틸인 제조방법.

【청구항 5】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 효소는 미생물, 동물 또는 식물 유래의 리파아제(lipase), 프로테아제(protease) 또는 에스테라아제(esterase) 중에 선택되는 제조방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 효소는 리파아제인 제조방법.

【청구항 7】

제 5 항에 있어서, 상기 효소는 *Pseudomonas* 유래 리파아제 AK, Toyobo Immobilized lipase, Liopprotein lipase, *Burkholderia* 유래의 리파아제 PS, AH, *Alcaligenes* 유래의 리파아제 QLM, 및 *Candida* 유래 리파아제 OF에서 선택된 하나 또는 둘 이상인 제조방법.

【청구항 8】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 효소의 가수분해 반응을, 수용액, 또는 소량의 유기용매를 포함하는 유기용매-수용액 혼합액 중에서 행하는 제조방법.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 유기용매는, 아세톤, 아세토나이트릴, 알코올 등의 친수성 용매나, 이소프로필에테르, tert-부틸 메틸 에테르(TBME), 클로로포름, 디클로로메탄, 사염화탄소, 헥산, 톨루엔 등의 소수성 용매이거나, 또는 이들의 혼합 용매인 제조방법.

【청구항 10】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 효소의 가수분해 반응을 0-60℃ 및 pH 4-12에서 행하는 제조방법.

【청구항 11】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 반응계가 수용액만으로 이루어진 경우에는, 유기용매를 사용하여 미반응 에스테르 화합물(R형 또는 S형 광학이성질체)을 추출하고, 반응계가 유기용매-수용액 혼합액으로 이루어진 경우에는, 미반응 에스테르 화합물이 용해되어있는 유기용매층을 분리함으로써 이를 분리하는 방법.

【청구항 12】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 효소는 담체에 고정화되어있는 효소인 제조방법.

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.13
【제출인】	
【명칭】	주식회사 엘지생명과학
【출원인코드】	1-2002-030835-0
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	손창규
【대리인코드】	9-1998-000300-9
【포괄위임등록번호】	2002-087038-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0081152
【출원일자】	2002.12.18
【발명의 명칭】	효소를 이용한 (R)- 또는 (S)-N-(2,6-디메틸페닐)알라닌과 그것의 대응 에스 테르 화합물의 입체이성질체의 제조방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-02-0420004-84
【접수일자】	2002.12.18
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박오진
【성명의 영문표기】	PARK, oh-jin
【주민등록번호】	680321-1639929
【우편번호】	305-755
【주소】	대전광역시 유성구 어은동 한빛 APT 109-1206
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이상후

【성명의 영문표기】

LEE, Sang Who

【주민등록번호】

600322-1010916

【우편번호】

305-762

【주소】

대전광역시 유성구 전민동 엑스포 APT 506-1704

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

박태운

【성명의 영문표기】

PARK, tae-yoon

【주민등록번호】

720226-1768311

【우편번호】

305-340

【주소】

대전광역시 유성구 도룡동 388-11 럭키연립 6호

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

이상현

【성명의 영문표기】

LEE, Sang Hyung

【주민등록번호】

750305-1796711

【우편번호】

305-340

【주소】

대전광역시 유성구 도룡동 LG화학 사원 APT 7-207

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

정원교

【성명의 영문표기】

JOUNG, Won-Kyo

【주민등록번호】

650405-1405936

【우편번호】

305-330

【주소】

대전광역시 유성구 지족동 열매마을 APT 303-1004

【국적】

KR

【발명자】

【성명의 국문표기】

서병우

【성명의 영문표기】

SUH, Byoung-Woo

【주민등록번호】

570924-1122711

【우편번호】	305-721
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 럭키하나 APT 105-401
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최증순
【성명의 영문표기】	CHOI, Jeung-soon
【주민등록번호】	720312-1476113
【우편번호】	305-340
【주소】	대전광역시 유성구 도룡동 LG화학 사원 APT 3-213
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	조군호
【성명의 영문표기】	JOE, GOONHO
【주민등록번호】	570323-1405811
【우편번호】	305-721
【주소】	대전광역시 유성구 신성동 럭키하나 APT 106-603
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정재호
【성명의 영문표기】	CHEONG, Jae Ho
【주민등록번호】	710222-1011149
【우편번호】	302-777
【주소】	대전광역시 서구 둔산 2동 샘머리 아파트 110-1004호
【국적】	KR
【취지】	특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인 손창규 (인)
【수수료】	
【보정료】	11,000 원
【기타 수수료】	원
【합계】	11,000 원